



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



**Estudos de Modelagem Molecular da Piperina e CYP3A4: A
Influência na Biodisponibilidade de Fármacos**

Ramon Guerra de Oliveira

João Pessoa – Paraíba

2015

Ramon Guerra de Oliveira

**Estudos de Modelagem Molecular da Piperina e CYP3A4: A
Influência na Biodisponibilidade de Fármacos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Farmácia do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade de Federal da Paraíba
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Farmácia, sob orientação
do Prof. Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida
Vasconcellos.

João Pessoa- Paraíba
2015

O48e

Oliveira, Ramon Guerra de.

Estudos de modelagem molecular da piperina e CYP3A4: a influência na biodisponibilidade de fármacos / Ramon Guerra de Oliveira. - - João Pessoa: [s.n.], 2015.

37f. : il.

Orientador: Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Piperina. 2. Inibição enzimática. 3. *Docking molecular*. 4. CYP3A4.

BS/CCS/UFPB

CDU: 615.8(043.2)


Ramon Guerra de Oliveira

**Estudos de Modelagem Molecular da Piperina e CYP3A4: A
Influência na Biodisponibilidade de Fármacos**

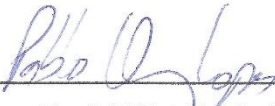
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia, sob orientação
do Prof. Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida
Vasconcellos.

Aprovado em: 02 / 06 / 2015

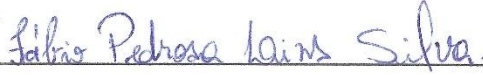
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos
Orientador (Universidade Federal da Paraíba)



Prof. MSc. Pablo Lopes de Queiroz
Examinador Interno (Universidade Federal da Paraíba)



Prof. Dr. Fábio Pedrosa Lins Silva
Examinador externo (Universidade Federal da Paraíba)

*Este trabalho é dedicado a todos que participaram
direta ou indiretamente de sua realização.*

À minha família, pelo apoio e incentivo.

*Aos meus amigos, pela força e suporte que
me deram durante toda a graduação.*

Agradecimentos

À minha **família**, pelo amor, paciência, compreensão e inspiração durante todo esse período de estudo.

Ao Professor Dr. **Mário Luiz Araújo Almeida Vasconcellos**, meu orientador de iniciação científica, por toda a partilha de saber, paciência, apoio, pelos conhecimentos transmitidos, cordialidade com que sempre me recebeu durante toda a minha graduação e pela contribuição para minha formação acadêmica.

Aos meus amigos do **LASOM**: Everton, Chico, Suervy, Fábio, João Paulo, Wagner, Claudio, Sara, Anna, Danielle, Guilherme, Dayse, Rodrigo, Saulo, Thiago.

Ao meu coorientador **Edilson Beserra**, pela disponibilidade e amizade por esses anos todos.

Aos meus amigos e irmãos que conheci durante o intercâmbio nos **Estados Unidos – CSF 117**- Thiago Pinho, Alisson Marczewski, Luiz Fernando, Gustavo Livrare, Vinicius Sartori, Gustavo Pinheiro, Ney Ramos.

Ao Examinador Professor MSc. **Pablo Lopes de Queiroz** pela disponibilidade em fazer parte da banca examinadora desse trabalho e contribuir cientificamente com o mesmo.

A toda **turma de Farmácia 2009.1**, agradeço por todos os momentos que passamos juntos de 2009 até 2013. A toda **turma de farmácia 2010.2** os quais me acolheram de forma única e me proporcionaram bons momentos durante 2014 e 2015.

A minha Fernanda Subrinho por todos esses anos de amizade e companheirismo.

Aos **Magotes** Alisson Igo, Willian Vieira, Leonardo Saldanha, Sirliel Mamede, Valmir Filho, Richard Couras.

A todos os professores da graduação que contribuíram para minha formação acadêmica.

RESUMO

A piperina é o principal alcalóide da *Piper nigrum* Linn. usado como condimento e na medicina popular. Nós apresentamos um estudo de ancoramento molecular de suporte aos dados experimentais sobre o aumento na biodisponibilidade dos fármacos: propranolol, teofilina, fenitoína, nevirapina, rifampicina, nimesulida, pirazinamida, carbamazepina, e esparteína na presença de piperina. O complexo formado entre a piperina e CYP3A4 se mostrou o mais estável de todos, com a energia de ligação de -8,60 kcal / mol. Isto explica o mecanismo relacionado a interações descritas do tipo fármaco-erva, uma vez que a melhor ancoragem de piperina no sítio ativo do CYP3A4 pode impedir a interação da formação dos complexos droga-enzima, aumentando a biodisponibilidade dos fármacos considerados.

Palavras-chave: Piperina, inibição enzimática, Docking Molecular, CYP3A4.

ABSTRACT

Piperine is the major alkaloid of *Piper nigrum* Linn., used as spice and in popular medicine. We present a molecular docking study supporting experimental data about the enhance in bioavailability of propranolol, theophylline, phenytoin, nevirapine, rifampicin, nimesulide, pyrazinamide, carbamazepine, and spartein in the presence of piperine. The complex formed with piperine and CYP3A4 was shown to be the most stable of all, with the binding energy of -8.60 kcal/mol. This explain the related mechanism of interaction drug-herb, since the better anchoring of piperine in the active site of CYP3A4 can hinder the drug-enzyme interaction, increasing the bioavailability of the considered drugs.

Keywords: Piperine, Enzymatic Inhibition, Molecular Docking, CYP3A4.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: Metabolismo normal dos fármacos.....	13
Figura 2: Grupamentos HEME do citocromo.....	15
Figura 3: Ciclo catalítico do Citocromo P450.....	16
Figura 4: 10-gingerol (1), 8-gingerol (2), 6-gingerol (3) e Piperina (4)	19
Figura 5: Flavonóides Diosmina e Diosmetina.	20
Figura 6: Bioflavonoides Quercetina (1), Genisteina (2), e Naringina (3).	21
Figura 7: Triazola Cetoconazol (1), tiazola fluconazol (2) e imidazol abafungina (3).22	
Figura 8: Ritonavir (1) e modificações chave para inibição do CYP (2).	23
Figura 9: Docking molecular.....	24
Figura 10: Esquema do processo das conformações do Autodock 4.2.....	27

Sumário

1. Revisão da Literatura	12
1.1. Metabolismo de Fármacos.....	12
1.2. Sistema Microssomal-Citocromo P450	13
1.3. Inibição e Indução enzimática do citocromo.....	16
1.4. Produtos Naturais e Sintéticos como Biomoduladores	18
1.5. “Docking” molecular	23
<i>Artigo.....</i>	<i>30</i>
Referências Bibliográficas.....	36

Revisão de literatura



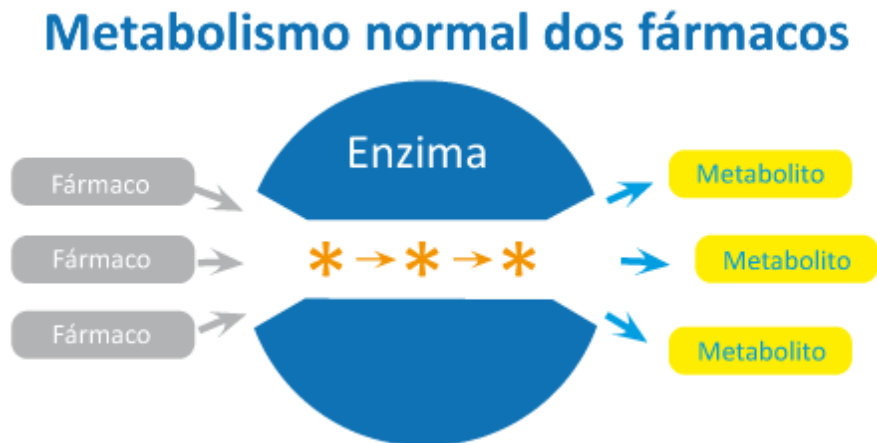
1. Revisão da Literatura

1.1. Metabolismo de Fármacos

Medicamentos são extremamente necessários para os tratamentos de enfermidades, mas ao passo que curam são também compostos estranhos ao organismo, sendo denominados de xenobióticos (do grego *xenos* significa estranho e *biótico* relacionado a vida). Um fármaco ideal é considerado aquele que atua de forma seletiva em seu alvo, no caso dos estruturalmente específicos, e que seja eliminado evitando assim possível acúmulo no organismo. Quanto mais tempo o fármaco permanece no organismo, maiores são os possíveis efeitos colaterais. Como uma via importante para a eliminação desses compostos exógenos, através de reações químicas, temos os processos que em conjunto são chamados metabolismo (TAXAK, BARATHAM, 2014).

O processo de metabolismo dos fármacos geralmente objetiva transformar uma espécie lipofílica em uma outra mais hidrofílica, através de reações catalisadas por sistemas enzimáticos (F) facilitando o processo de eliminação renal. Moléculas orgânicas lipofílicas sofrem um processo de reabsorção passiva a nível renal, voltando a circulação sistêmica ou acumulando-se nos adipócitos podendo levar a reações tóxicas (BRUNTON, et.al., 2011). As espécies formadas a partir das reações catalisadas por essas enzimas denominam-se metabólitos e podem ser divididos em dois grandes grupos: Metabólitos de fase 1 e metabólitos de fase 2.

Figura 1: Metabolismo normal dos fármacos.



Fonte: Adaptado de: <https://elcaminogmi.dnadirect.com>

Os metabólitos de fase 1 são produtos de funcionalização, ou seja, ocorre a incorporação ou interconversão de grupos funcionais, geralmente dando origem espécies químicas mais polares, com o intuito de eliminar a molécula em questão, deixar pontos de ancoragem para as reações de fase 2, ou até mesmo ativar moléculas inativas como é o caso dos pró-fármacos. Os metabólitos de fase 2 são produtos de conjugação, havendo a formação de adutos orgânicos geralmente mais polares que o metabólito inicial e é a forma final de eliminação dos xenobióticos pela via renal. O principal local de transformação desses metabólitos é no fígado, embora outros tecidos como pulmões, trato digestivo e rins contribuem de maneira menos. (FOYE, 2008).

1.2. Sistema Microsomal-Citocromo P450

As vias de produção dos metabólitos do corpo humano são bastante complexas, sendo os maiores representantes as enzimas que constituem o sistema conhecido como citocromo P450, as quais são um conjunto de monooxigenases ligadas a membrana no retículo endoplasmático liso do fígado e outros tecidos extra-hepáticos. O sistema microsomal P450 é constituído basicamente por dois componentes: Uma Heme proteína denominada P450 e uma flavoproteína NADPH-

P450 redutase. A fração P450 serve de sítio de ligação para oxigênio ao passo que a redutase serve como transferidor de elétrons do NADPH para P450. Vale salientar que o fosfolipídio Fostatidilcolina, facilita o transporte de elétrons criando um ambiente carregado negativamente em um pH neutro. O mecanismo pelo qual tais enzimas geram espécies oxigenadas é por meio de uma complexa cadeia de transporte de elétrons. O composto de coordenação formado entre a protoporfirina e o enxofre da cisteína forma um complexo com o monóxido de carbono resultando em um complexo que absorve energia radiante no comprimento de onda de 450 nm, daí a denominação P450. Outras moléculas como o NADPH e oxigênio molecular são necessárias para geração dos compostos oxigenados catalisados por esse sistema (FOYE, 2008).

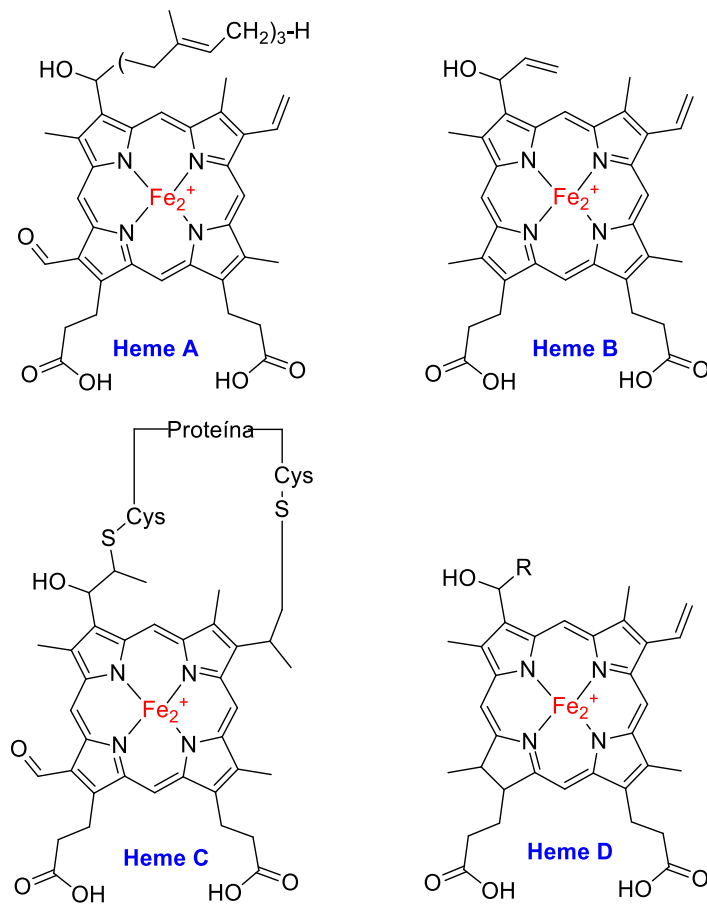
Vários fatores estão envolvidos na taxa de transformação de metabólitos pelas enzimas do citocromo, dentre eles podemos citar: estado nutricional, idade, raça, tipo de tecido etc. Como exemplos de reações catalisadas por esse sistema enzimático podemos citar as oxidações de alcanos e compostos aromáticos, epoxidação de alcenos e hidrocarbonetos halogenados, dealquilação de aminas secundárias e terciárias. A introdução de um grupamento hidroxila em uma espécie lipofílica, por exemplo, resulta em um ponto de ancoramento para formação de outros conjugados mais polares (ácido glicurônico, sulfato, aminoácidos e glutatona) também conhecidos como metabólitos de fase II (FOYE, 2008).

As hemeoproteínas que denominam o grupo de enzimas do citocromo são compostas por quatro anéis pirrólicos unidos por ligações $-\text{CH}=\text{}$ que resulta na formação de um complexo de coordenação com o ferro planar, que varia entre os estados oxidado (Fe^{2+}) e reduzido (Fe^{3+}) (JONES; POOLE, 1985). Tal grupamento prostético Heme pode variar em termos estruturais, dando origem aos grupos: a, b, c e d; os quais diferem apenas nos substituintes das cadeiras porfirínicas (**Erro! Fonte e referência não encontrada.**) (KÄPPELI, 1986).

- ❖ **Heme a:** Têm uma cadeia lateral de formil na posição 3, e cadeias de ácido propiônico nas posições 13 e 17;
- ❖ **Heme b:** A porfirina que o constitui é um proto-heme IX, tem substituintes vinilo nas posições 3 e 8;
- ❖ **Heme c:** Apresenta ligações nas posições 3 e 8 com a cisteína da proteína, no lugar dos grupos vinilas do heme b;

❖ **Heme d:** Apresenta uma dihidro-porfirina.

Figura 2: Grupamentos HEME do citocromo.

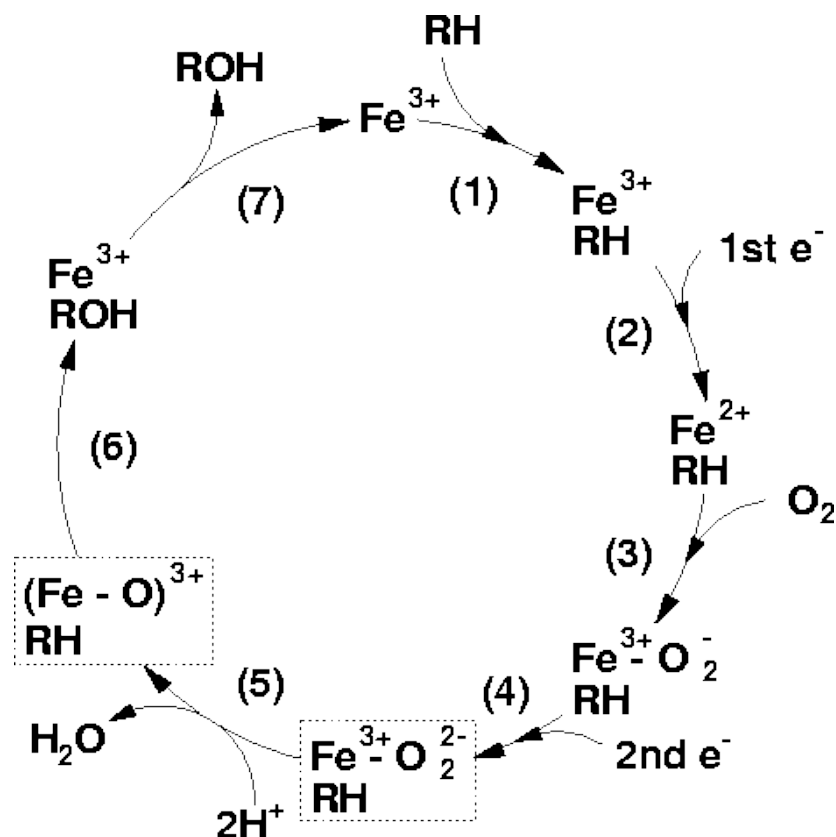


No que compreende o grupo b, encontramos o sistema do citocromo P450, o qual apresenta mais de 2700 isoformas identificadas. Tal variedade de entidades catalíticas gerou a necessidade de uma divisão em famílias, tendo como base o tipo de reação que promoviam a catálise, seus respectivos substratos e propriedades espectrais (COON et al., 1992). Dentro da classificação temos 74 famílias das quais 14 são identificadas em mamíferos, as quais se subdividem em 26 subfamílias (SAKAKI; INOUE, 2000).

O mecanismo proposto para o ciclo catalítico (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) de tal sistema inicialmente consiste na ligação reversível do Fe^{+3} a molécula do substrato, resultando em um complexo análogo ao complexo enzima substrato onde a ligação do substrato facilita a primeira transferência de elétrons (1).

O complexo então formado entre o substrato- Fe^{3+} -P450 é reduzido à Fe^{2+} -P450-RH por um elétron proveniente do NADPH e transferido pela flavoproteína (NADPH-P450 redutase) (2). O complexo Fe^{2+} -P450-Substrato já reduzido, prontamente se liga ao oxigênio molecular como um sexto ligante do ferro para formar o complexo Fe^{2+} -P450-Substrato- O_2 (3). O Complexo então sofre rearranjo por ressonância como resultado da forte eletronegatividade do oxigênio dando origem ao complexo Fe^{3+} -P450-superóxido o qual sofre uma redução pelo segundo elétron da flavoproteína (ou possivelmente o citocromo b5) (4). Ocorre a clivagem da ligação O-O e a liberação de uma molécula de água (5). Retirada do átomo de hidrogênio do substrato e adição do grupo hidroxila (6). Liberação do produto resultante e reestabelecimento do ciclo catalítico (7). (SAKAKI; INOUE, 2000).

Figura 3: Ciclo catalítico do Citocromo P450.



1.3. Inibição e Indução enzimática do citocromo.

As enzimas responsáveis pelos processos metabólicos geralmente podem sofrer regulação (indução ou inibição). Ambos os processos afetam o perfil

farmacocinético dos xenobióticos e às vezes podem levar a graves consequências. A administração de um fármaco ou uma substância específica por um tempo prolongado e dose dependente pode aumentar seu próprio metabolismo. Este efeito fisiológico que é responsável para a desintoxicação da maioria dos compostos é conhecido como a indução enzimática.

O aumento no metabolismo de fármacos ocorre por um aumento na transcrição gênica em resposta de um processo adaptativo do organismo logo após exposição prolongada a um agente indutor. Diante do tempo necessário para tal exposição, tais efeitos demoram a ser pronunciados, porém podendo durar de uma a três semanas. A indução enzimática vem sendo estudada extensivamente, porém com ênfase na toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese e interações medicamentosas. Como consequências temos um aumento na taxa de metabolismo, aumento no metabolismo de primeira passagem, e redução da biodisponibilidade, com maior formação de metabólitos (FOYE, 2008). Vale salientar que o xenobiótico não necessariamente irá induzir a expressão da mesma isoformas que o metaboliza. Um exemplo desse fenômeno ocorre com a fenitoína, a qual é metabolizada pela CYP2C9 e induz o CYP3A4. Entretanto pode ser um problema no tocante aos pró-fármacos, pois seu excessivo metabolismo gera suas espécies ativas com atividade farmacológica podendo levar a intoxicações. Alimentos também constituem uma possível fonte de indução enzimática. Recentemente foi descrito que brócolis, couve-flor, repolho e couve de Bruxelas tem a capacidade de induzir a expressão das isoformas de citocromos devido a presença de tiocianatos. (JUGE et al., 2007; VILLA-CRUZ et al., 2009).

Por outro lado, a inibição destas enzimas do citocromo é normalmente referida na literatura para as interações de drogas e problemas clínicos. Devido ao caráter polissubstrato dessas enzimas, algumas dessas interações geralmente ocorrem com frequência. Os inibidores do citocromo podem ser classificados em três categorias baseadas em seu mecanismo de ação: Inibidores reversíveis, complexação por metabólito intermediário e mecanismo de inativação de “suicida” (BARRY, 1990). Os inibidores reversíveis podem ser descritos como uma interação entre uma molécula dentro do anel protoporfirínico e/ou os resíduos da apoproteína. Este tipo de inibição tem um impacto importante no papel do metabolismo oxidativo e dos xenobióticos que seguem por esta via metabólica, porém seus efeitos cessam quando ocorre a

dissociação do ligante no sítio catalítico do citocromo (SHUGARTS, et al.,2010). Alguns fármacos como a cimetidina, antifúngicos azólicos, fluorquinolonas e quinidina podem promover tal inibição. A complexação por metabolito intermediário pode ser definido como a formação de um complexo estável entre o grupo heme, contendo ferro, e alguns grupos funcionais que quando metabolizados geram metabólitos que posteriormente formam complexos estáveis com o citocromo. Um exemplo são as nitrosaminas, que podem ser formadas por oxidação de aminas. Já a inativação suicida provém da formação de ligações covalentes entre metabólito e citocromo necessitando que seja sintetizada uma nova proteína para restaurar a atividade funcional do ciclo. (FOYE, 2008)

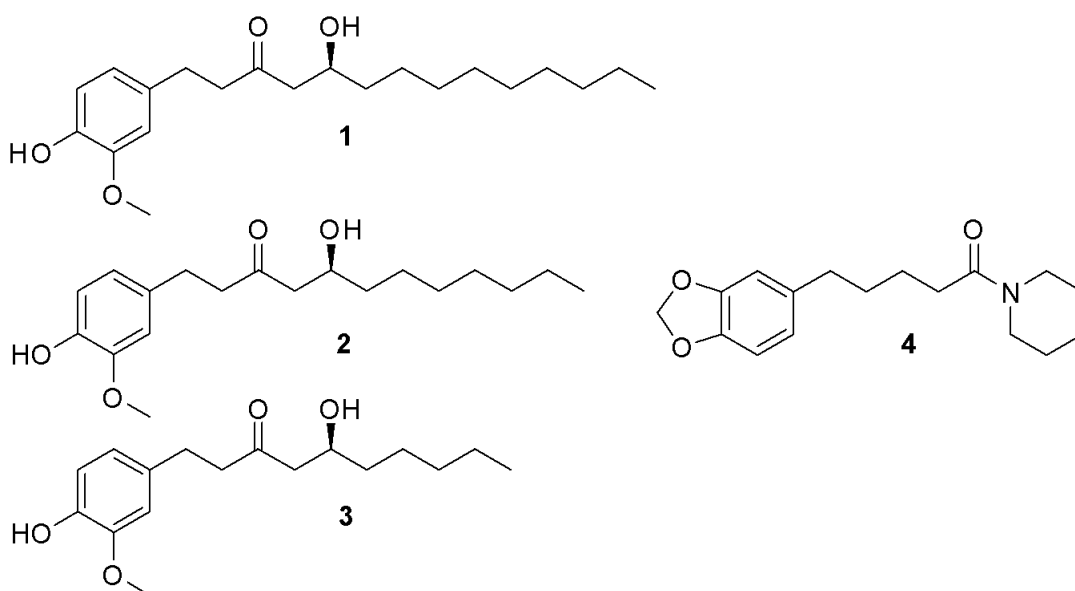
1.4. Produtos Naturais e Sintéticos como Biomoduladores

Por definição, um biomodulador é um agente capaz de aumentar ou diminuir a biodisponibilidade e eficácia de um medicamento ou outra substância bioativa, com o qual é coadministrado, ausente de qualquer atividade farmacológica na dose terapêutica usada. Este conceito foi primeiramente descrito por Bose em 1929, onde observou-se que o uso das folhas de Vasaka (*Adhatodavassica*) concomitante com pimenta longa aumentava o efeito antiasmático da planta em questão (RANDHAWA, 2011). Nesse contexto dos produtos naturais, diversas plantas ou combinação de ervas são usadas para fins terapêuticos há muito tempo, onde podemos destacar o sistema terapêutico Ayurveda o qual data de mais de 7000 anos com criação na Índia. Estas formulações fitoterápicas são muitas vezes utilizadas para aumentar a biodisponibilidade, distribuição nos tecidos, e a eficácia de drogas, especialmente com fraca biodisponibilidade oral e diminuindo os efeitos adversos no processo.

A piperina (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) é um produto natural presente em algumas formulações, sendo o alcaloide biomodulador mais antigo já isolado e purificado, presente na pimenta-preta (*Piper nigrum* Linn.) onde é comumente usada como especiaria e em vários sistemas tradicionais de medicina popular, incluindo Ayurveda (FERREIRA, 2012). Frutos secos de pimenta-longa (*Piper longum*), pimenta-preta (*Piper nigrum*) e rizomas secos de gengibre

(*Zingiberofficinalis*) são usados na Ayurveda com o nome de “Trikatu” os quais são relatados em muitas preparações. Os mecanismos responsáveis pelas propriedades biomoduladoras da piperina são a inibição das enzimas do sistema microsomal do citocromo P450 e da glicoproteína de permeabilidade (P-gp) (ATAL, 1985). Foi observado na clínica que a piperina aumenta a área sob a curva (AUC) da fenitoína, propranolol, e teofilina em voluntários saudáveis, bem como as concentrações plasmáticas de rifampicina em pacientes com tuberculose pulmonar e muitas outras drogas (HU, 2005). Em novembro de 2009, uma formulação contendo piperina e Rifampicina foi desenvolvido pelo Instituto Indiano de Medicina Integrativa, e o resultado desta nova composição farmacêutica é uma diminuição da dose usual de rifampicina de 400 mg para 200 mg, mantendo a mesma eficácia (CHAWLA, 2010). Além disso, os componentes do gengibre presente e utilizados na Ayurveda são: 10-gingerol, 8-gingerol e 6-gingerol (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), os quais demonstraram propriedades de inibição em várias isoformas de CYP, tais como CYP2C9, inibição moderada exercida sobre CYP2C19 e CYP3A4, e inibição fraco do CYP2D6 (LI, 2013).

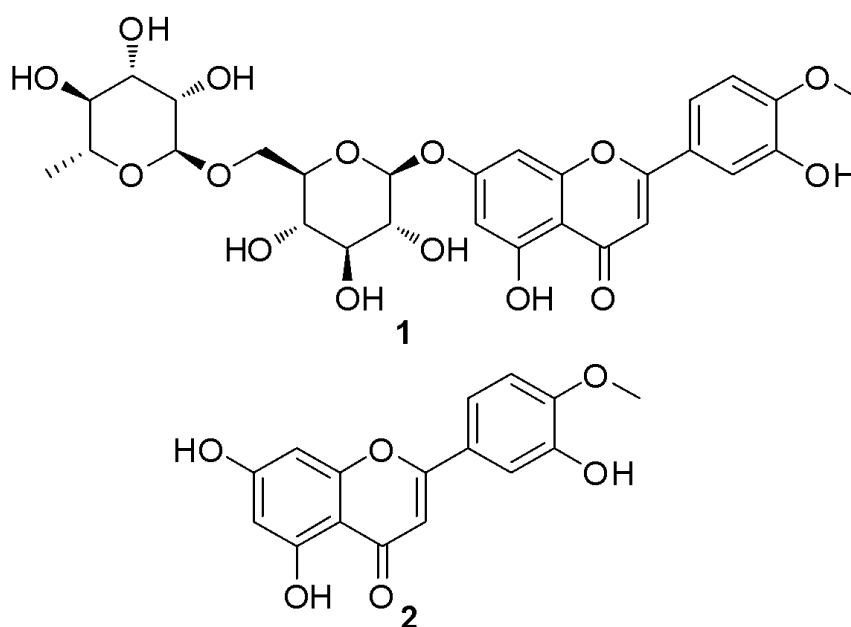
Figura 4: 10-gingerol (1), 8-gingerol (2), 6-gingerol (3) e Piperina (4)



Muitas ervas e produtos alimentícios que são atualmente enriquecidos com flavonoides naturais, têm se mostrado significativos em alterar a concentração de alguns fármacos em seres humanos. Os flavonoides são constituintes de alimentos

consumidos frequentemente, tais como vegetais, frutos, cereais ou bebidas derivadas de plantas, bem como componentes de formulações à base de plantas. Mais de 6.500 flavonoides têm sido descobertos até agora. Além de seus efeitos antioxidantes bem conhecidos, flavonoides também têm grandes impactos sobre o metabolismo de drogas. Estes produtos naturais são reconhecidos por serem capazes de inibir as enzimas do citocromo P450 (WANG, 2014). Em 2007, Rajnarayana e colaboradores relataram um pré-tratamento de voluntários saudáveis com a diosmina, flavonoide glicosilado e sob a forma aglicona diosmetina (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), onde se observou um aumento da área sob a curva (AUC) do diclofenaco (RAJNARAYANA, 2007).

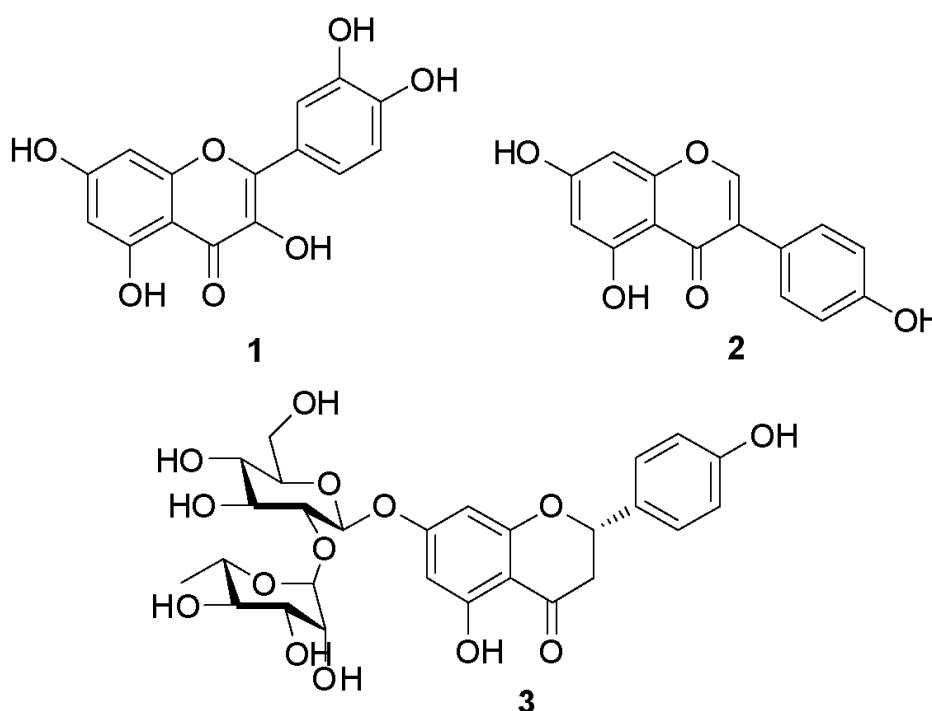
Figura 5: Flavonóides Diosmina (! e Diosmetina.



As interações do tipo erva-fármaco devem ser consideradas como fonte importante de alterações dos efeitos de medicamentos, visto que produtos vegetais são utilizados comumente como condimento na culinária ou na medicina popular. Um exemplo dessas interações é o caso com o suco de toranja (um híbrido, resultante do cruzamento do pomelo com a laranja), que acarreta em acentuadas interações erva-fármaco principalmente devido à inibição do CYP3A4 intestinal, resultando no aumento da concentração plasmática de felodipina, nitrendipina, saquinavir, ciclosporina, terfenadina e outros compostos (BAILEY, 1998; KANE, 2000). A

explicação para este fenômeno se baseia principalmente na inibição de ambas as enzimas CYP e proteína P-gp pelos compostos polifenólicos, como representante principal a naringina (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) no trato gastrointestinal. A quercetina e genisteína (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) são responsáveis pelo aumento na biodisponibilidade de diltiazem, paclitaxel, digoxina, doxorubicina, tamoxifeno pelo mesmo mecanismo (RANDHAWA, 2011). O resultado desta melhor afinidade com o sítio catalítico do CYP450 é que os fármacos/xenobióticos em geral são metabolizados em menor quantidade pelo caráter competitivo que ocorre, mantendo concentrações plasmáticas relativamente mais altas dos compostos não metabolizados. Um fator preocupante é que fármacos que possuem baixa biodisponibilidade podem ter suas concentrações plasmáticas bem mais elevadas que os valores usuais com uso concomitante desses produtos.

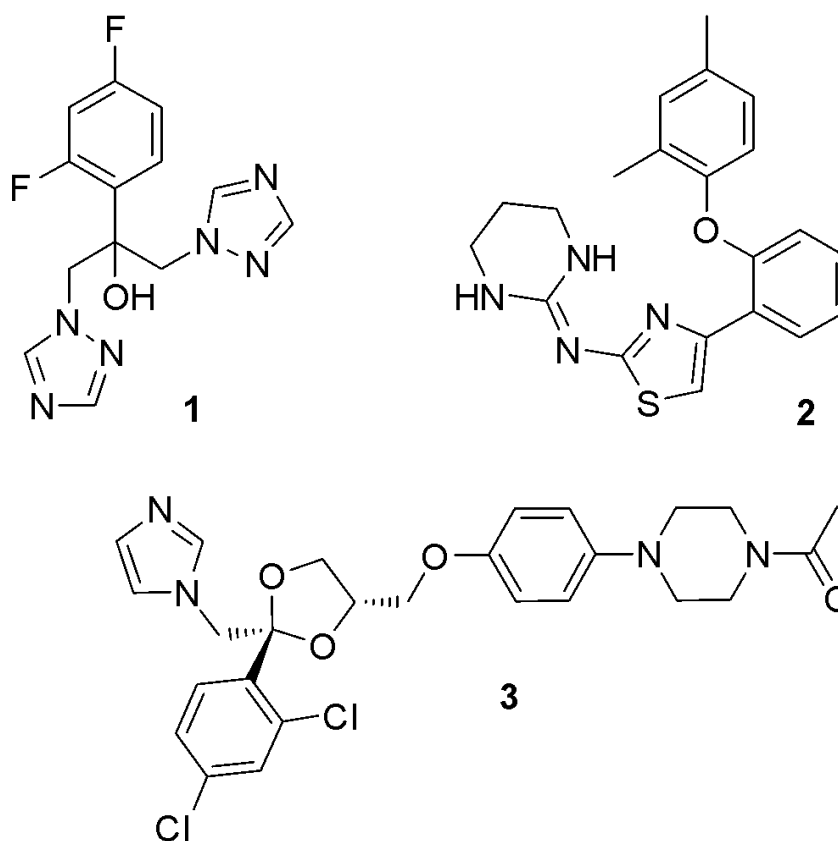
Figura 6: Bioflavonoides Quercetina (1), Genisteína (2), e Naringina (3).



Do mesmo modo que os produtos naturais, alguns compostos sintéticos, mais especificamente fármacos, são capazes de aumentar a biodisponibilidade de alguns compostos. O exemplo mais comum de produtos sintéticos que foram descobertos

como inibidores potentes de CYP são os antimicóticos azólicos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Esta classe de drogas é geralmente utilizada para o tratamento de infecções fúngicas primárias e também como tratamento profilático ou de suporte de pacientes imunossuprimidos. Uma grande variedade de interações medicamentosas do tipo fármaco-fármaco foi relatada na literatura, e o principal mecanismo envolvido é a inibição do CYP3A4 pelo imidazóis, triazóis e tiazóis (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) (DVORAK, 2011).

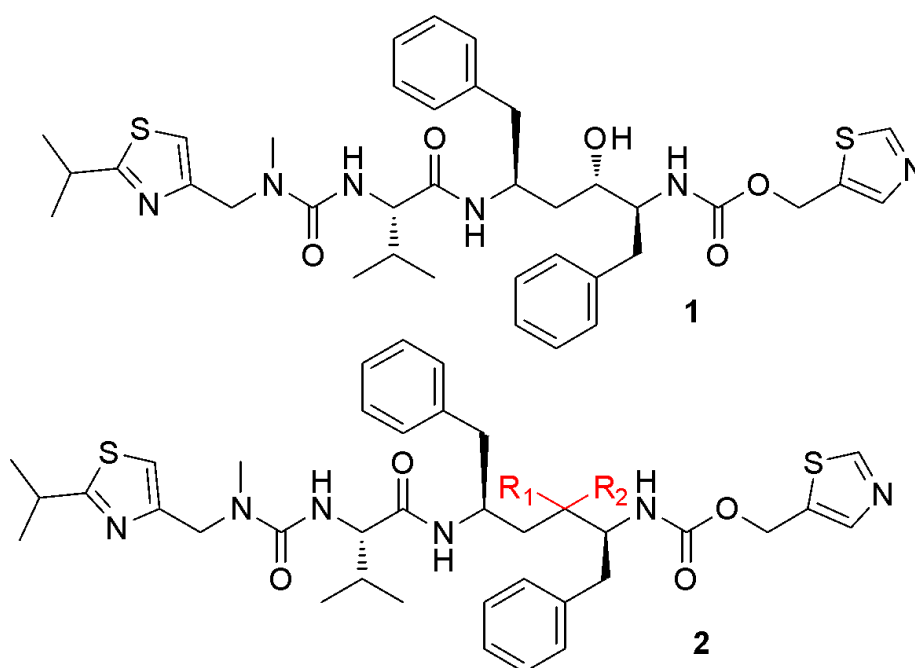
Figura 7: Triazola Cetoconazol (1), tiazola fluconazol (2) e imidazol abafungina (3).



Outra classe de compostos potentes inibidores de CYP são os inibidores de protease (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Suas propriedades inibitórias as vias usuais de metabolismo vieram como fruto de um efeito adverso. Porém, a partir do caso do ritonavir se observou uma oportunidade única: melhorar a biodisponibilidade de outros fármacos que possuíam elevado metabolismo de primeira passagem bem como baixa biodisponibilidade (JAYAKANTHAN, et al., 2010). Vários

estudos foram relacionados nas doses terapêuticas sub de ritonavir, a fim de aumentar a biodisponibilidade de alguns medicamentos que são extensivamente metabolizados por enzimas CYP que levam a uma fraca biodisponibilidade. O principal problema dessa abordagem é a possibilidade de resistência cruzada utilizando pequenas doses de Ritonavir e também os efeitos colaterais que são distúrbios lipídicos e como indutor de enzimas que metabolizam drogas (LIU, et al., 2013). Nesse sentido recentes esforços têm sido feitos para desenvolver vários inibidores de CYP baseados na estrutura do núcleo do ritonavir (Figura 8), mas mantendo o efeito inibidor de CYP (XU, et al., 2013). Recentemente a estratégia adotada foi planejar inibidores provenientes da remoção do grupo hidroxila chave, o qual confere a atividade anti protease.

Figura 8: Ritonavir (1) e modificações chave para inibição do CYP (2).



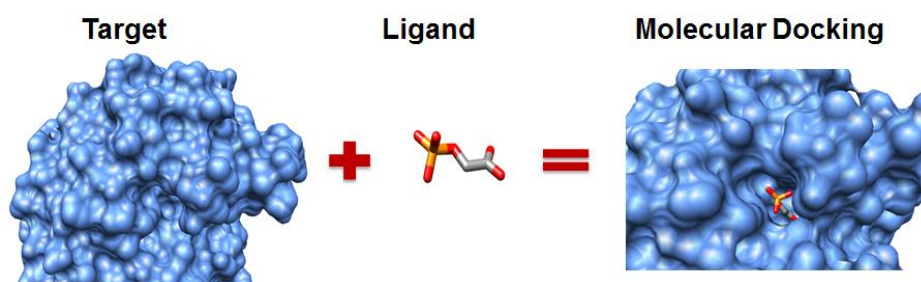
1.5. “Docking” molecular

Interações moleculares incluindo proteína-proteína, enzima- substrato, proteína-ácidos nucleicos, e fármacos-ácidos nucleicos desempenham papel essencial em diversos processos biológicos, tais como: transdução de sinal, transporte, regulação celular, controle da expressão gênica, inibição enzimática, reconhecimento antígeno anticorpo e até formação de multidomínios proteicos. Tais interações geralmente levam a formação de complexos de estabilização os quais são

essenciais para desenvolver suas respostas biológicas (HERNANDÉZ-SANTOYO, et al., 2006). A estrutura terciária de tais proteínas é necessária para compreensão do processo de interação, podendo ser determinada através de técnicas de ressonância magnética nuclear e cristalografia de raios-x.

Nesse sentido o “docking molecular”, também chamado de atracagem molecular, é um procedimento computacional bastante utilizado atualmente, o qual visa estabelecer as características de interação entre um ligante (micromolécula) e um alvo biológico (biomacromolécula) (Erro! Fonte de referência não encontrada.) KITCHEN, 2004; GOHLKE, 2002). O processo de atracagem envolve basicamente duas etapas: a predição de conformações e orientações de ligantes nos sítios de ligação dos biorreceptores, bem como a atribuição de valores de energia de interação dos complexos, baseados no cálculo de potenciais clássicos, também chamadas de escores (MENG, et al., 2004).

Figura 9: Docking molecular.



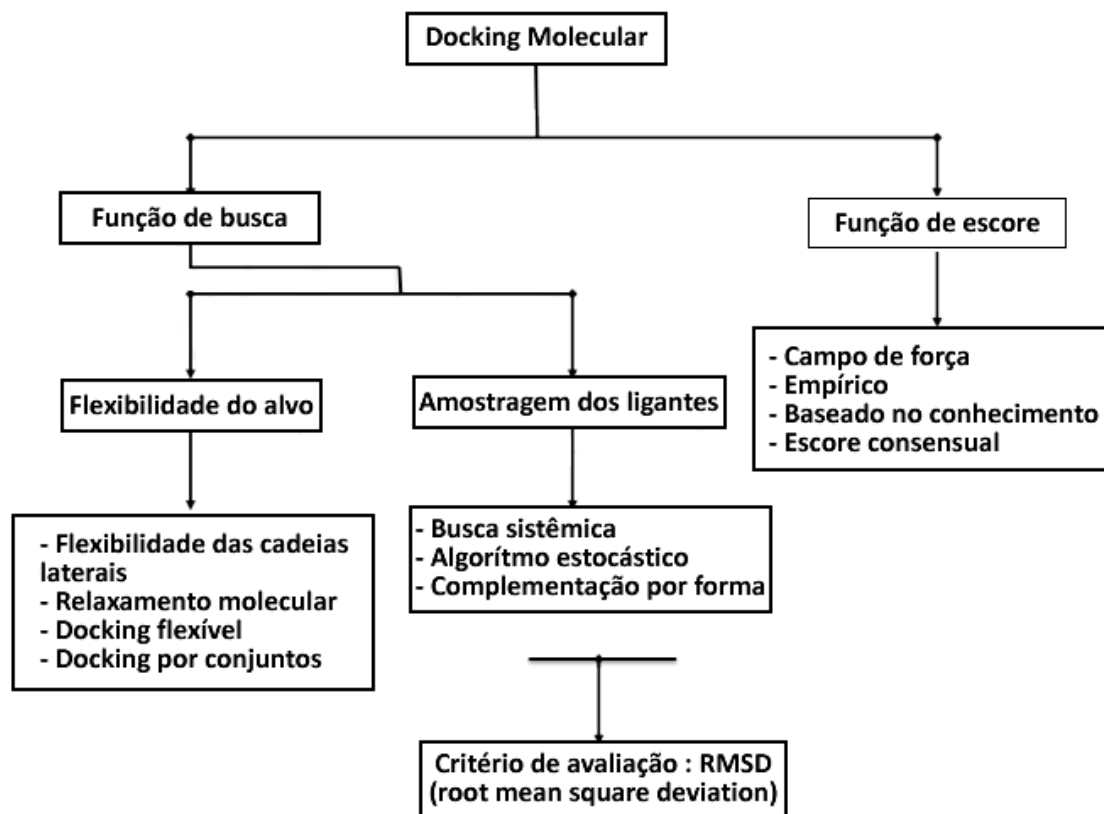
O grau de afinidade de um ligante em relação ao sítio ativo da biomacromolécula é formalmente estimada pela energia livre de ligação de Gibbs (ΔG_L). Na cadeia de pesquisa e desenvolvimento de fármacos as indústrias farmacêuticas realizam triagem de milhares de moléculas em um determinado alvo, e consequentemente avaliação do grau de interação entre cada molécula e seu receptor alvo. Dessa forma para se determinar com precisão um valor de energia de ligação, a demanda computacional seria altíssima para as estações de trabalho. Por essa razão se faz necessário o desenvolvimento de novos métodos de avaliação mais rápidos, que, incluído nos algoritmos de “docking”, fossem capazes de ordenar com boa eficiência um conjunto de inibidores de acordo com sua afinidade. (KITCHEN, 2004). A grande limitação da técnica de “docking” talvez seja não esgotar as todas as

nuances das interações do meio biológico. Tais limitações podem estar relacionadas à falta de flexibilidade da proteína, como muitas vezes é considerada, e o tratamento bastante aproximado da solvatação. Além disso alguns autores consideram as funções de energia empregadas de natureza simplista. Estes problemas tem sido alvo de melhoramentos nos algoritmos de docking e do uso de abordagens mais refinadas e computacionalmente custosas como a dinâmica molecular (GANI, 2007; KITCHEN et al., 2004; TERAMOTO & FUKUNISHI, 2007).

Em geral, boa parte dos programas de docking utilizam como aproximação fundamental em seus cálculos o modelo de chave flexível e fechadura rígida (semi-flexível) (YURIEVA; AGOSTINO; RAMSLAND, 2001). Isto é, os graus de liberdade do alvo molecular não são considerados quando se minimiza a função-escore. Entretanto, sabe-se que a interação entre duas moléculas é um processo que afeta ambas as moléculas (YURIEVA; AGOSTINO; RAMSLAND, 2001) e que desconsiderar isto nas aproximações faz com que as conformações geradas pelo docking não tenham o peso que realmente deveriam ter na otimização das interações.

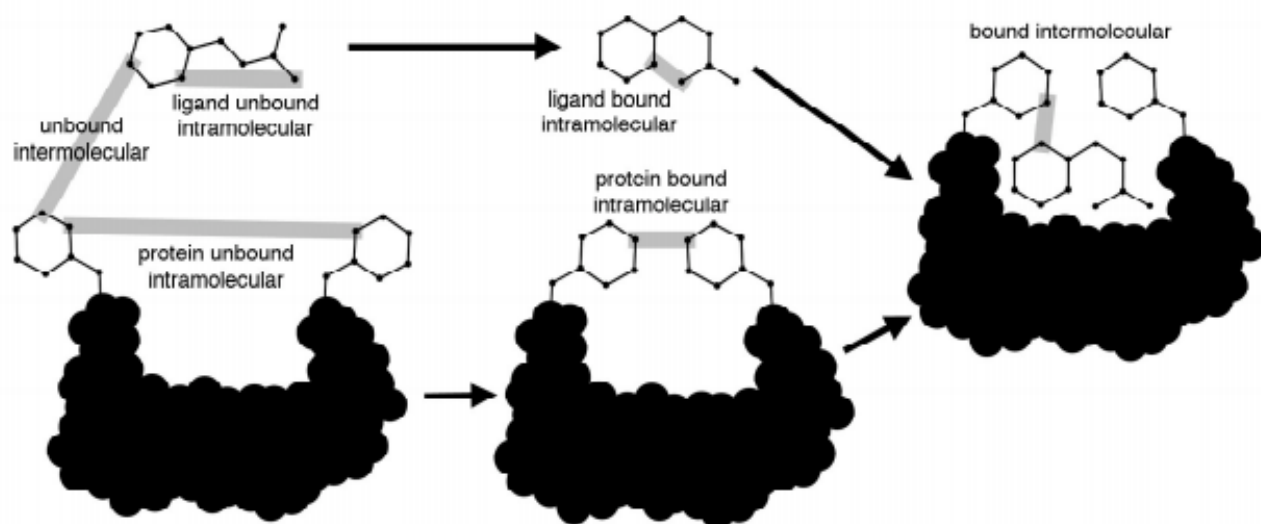
A flexibilidade é incluída apenas nos algoritmos mais sofisticados, dos quais o maior exemplo é o Rosetta (DAVIES et al, 2009; DAVIS; BAKER, 2009;). Isso porque a adição da flexibilidade do alvo molecular ao cálculo aumenta exponencialmente o tempo de cálculo e torna o docking impraticável (YURIEVA; AGOSTINO; RAMSLAND, 2001). Dessa forma, o procedimento mais usual aplicado no processo de docking é manter relativa flexibilidade do ligante e rigidez do alvo molecular. Ainda, como alternativa, alguns programas permitem manter alguns resíduos de aminoácidos no sítio de ligação flexíveis, como é o caso do programa Autodock. Independente da abordagem, um aspecto importante é a avaliação do tratamento de um ligante nativo ao complexo enzimático, originalmente obtido, e cálculo do erro de superposição (RMS). Esta técnica é conhecida como “re-docking”. (Esquema 1).

Esquema 1: Esquema geral do processo de docking molecular.



O software Autodock 4.2 (MORRIS et.al., 2010) utiliza um campo de força semi-empírico, parametrizado, para cálculo da energia livre utilizando um grande número de complexos macromolécula-inibidor (Figura 10).

Figura 10: Esquema do processo das conformações do Autodock 4.2.



Fonte: Adaptado do manual do Autodock.

O campo de força avalia ligação em dois passos. O ligante e a proteína começam em conformações não ligadas e a energia intramolecular é estimada para a transição dos estados ligados e não ligados. Em seguida, avalia a energia intermolecular do ligante e da proteína em suas conformações ligadas (MORRIS, 2010). O campo de força inclui seis pares de avaliações (V) e uma estimativa da entropia conformacional perdida durante o processo de ligação (ΔS_{conf}), em que L se refere ao "ligante" e P refere-se à "proteína" no processo de docking entre ligante e biomacromolécula de acordo com a Equação 1.

$$\Delta G = (V_{Ligado}^{L-L} - V_{N\tilde{a}o\ ligado}^{L-L}) + (V_{Ligado}^{P-P} - V_{N\tilde{a}o\ ligado}^{P-P}) + (V_{Ligado}^{P-L} - V_{N\tilde{a}o\ ligado}^{P-L} + \Delta S_{Conf})$$

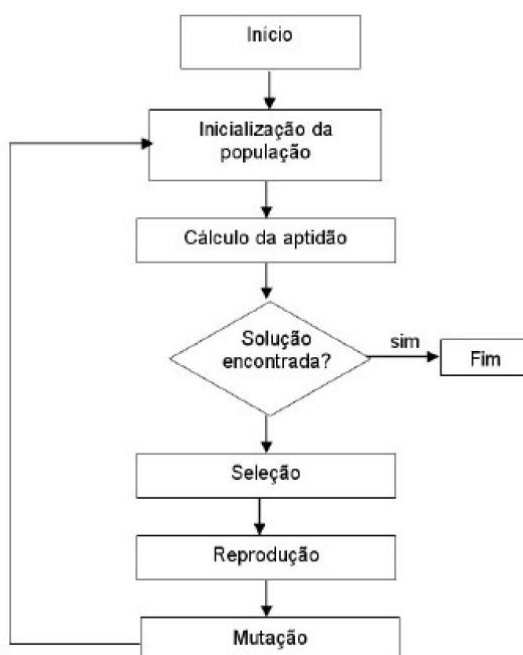
(EQ. 1)

Cada um dos termos energéticos dos pares inclui avaliações de dispersão / repulsão, ligação de hidrogênio, eletrostática e dessolvatação conforme descrito na Equação 2.

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2)} \quad (\text{EQ. 2})$$

Para busca das confirmações no processo de atracagem molecular, existem diversos algoritmos descritos. O método foi implementado na química computacional em meados dos anos 70, e utiliza os conceitos da genética: seleção natural e evolução. No decorrer do procedimento de “docking” molecular, o receptor é mantido rígido/flexível e a translação, orientação e conformação dos ligantes são explorados. Cada conformação do ligante no sítio ativo corresponde a um “cromossomo” o que se traduz em seu genótipo. Já a maneira como os átomos se distribuem no espaço, mais precisamente, a organização molecular do ligante é seu “fenótipo”. A seleção natural do processo pode ser descrita como a aptidão do ligante baseado em uma pontuação (escore) gerada pelo algoritmo do Autodock. A partir disso, os indivíduos mais aptos da geração atual são selecionados formando uma nova população por “cruzamento”. O processo de “crossover” há a troca de características genotípicas que se traduzem em geometria das conformações, por exemplo o ângulo. Em contrapartida a mutação ocorre uma alteração de um parâmetro geométrico por um fator aleatório, dessa forma evitando que o algoritmo convirja para os mínimos locais (Esquema 2) (ARMELLIN, 2010).

Esquema 2: Esquema geral do algoritmo genético.



Fonte: Adaptado de (ARMELIN, 2010)

Atualmente o docking molecular pode ser visto como uma ferramenta extremamente útil na predição teórica conformacional de ligantes em determinados sítios ativos. Cada vez mais se avança no processo de descoberta de novos algoritmos de busca e pontuação, o que demonstra o quanto a técnica está em desenvolvimento contínuo. No contexto do metabolismo, o docking molecular pode ser utilizado por indústrias e centros de pesquisa como uma ferramenta extremamente valiosa para predição de tais afinidades e aprimorar o processo da cadeia de desenvolvimento de fármacos.

Artigo



Artigo publicado na Revista Química Nova

A INFLUÊNCIA DA PIPERINA NA BIODISPONIBILIDADE DE FÁRMACOS: UMA ABORDAGEM MOLECULAR

Ramon G. de Oliveira^a, Edilson B. Alencar-Filho^b e Mário L. A. A. Vasconcellos^{a,*}^aDepartamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58059-900 João Pessoa – PB, Brasil^bColegiado de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina – PE, Brasil

Recebido em 15/05/2013; aceito em 20/08/2013; publicado na web em 24/09/2013

Artigo

THE INFLUENCE OF PIPERINE ON THE BIOAVAILABILITY OF DRUGS: A MOLECULAR APPROACH. Piperine is the major alkaloid of *Piper nigrum* Linn., used as a spice and in folk medicine. We present a molecular docking study supporting experimental data on the enhancement in bioavailability of propranolol, theophylline, phenytoin, nevirapine, nimesulide, pyrazinamide, carbamazepine, and spartein in the presence of piperine. The complex formed with piperine and CYP3A4 was shown to be the most stable of all, with a binding energy of -8.60 kcal/mol. This explains the related mechanism of drug-herb interaction, since the better anchoring of piperine in the active site of CYP3A4 can hinder the drug-enzyme interaction, thereby increasing the bioavailability of the drugs studied.

Keywords: piperine; enzymatic inhibition; molecular docking.

INTRODUÇÃO

Piperina (1-piperil-piperidina, **1**) é o alcalóide principal da pimenta-do-reino ou pimenta preta (*Piper nigrum* Linn.), a qual é comumente usada como condimento e também em vários preparos tradicionais da medicina popular.¹ Frutos secos de *Piper longum* (pimenta longa), *Piper nigrum* e rizomas secos de *Zingiber officinalis* (gingibre) são usados na medicina popular indiana *Ayurveda* (conhecimento médico desenvolvido na Índia há cerca de 7 mil anos), pelo nome de “Trikatu”.² Entre as suas atividades biológicas, a piperina apresenta atividade antimicrobiana,³ anti-inflamatória,⁴ antiparasitária (doença de Chagas e leishmaniose),^{5,6} propriedades antioxidantes, entre outros.¹

Considerando outros aspectos farmacológicos, a literatura descreve o aumento da biodisponibilidade de diversos fármacos, tais como o propranolol (**2**),⁷ fenitoína (**3**),⁸ nevirapina (**4**),⁹ esparteína (**5**),¹⁰ nimesulida (**6**),¹¹ pirazinamida (**7**), carbamazepina (**8**)¹² e teofilina (**9**),⁷ quando co-administrados com a piperina (**1**) (Figura 1). Em adição, alguns trabalhos relatam que a utilização de espécies de *Piper spp.* em geral, seja na dieta tradicional bem como em formulações à base de plantas, pode ser responsável pelo aumento da biodisponibilidade de fármacos, modulando seus metabolismos ao nível do complexo enzimático citocromo P450 (CYP450).^{13,14} Outros estudos têm demonstrado que a piperina (**1**) inibe a atividade constitutiva e induzida do CYP 450 *in vitro* e *in vivo*.¹⁵ O citocromo P450 (CYP450) corresponde a um conjunto de enzimas da superfamília do heme-tiolato, responsáveis pelo metabolismo oxidativo de xenobióticos.¹⁶ Em geral, os fármacos são metabolizados para evitar efeitos tóxicos de acumulação. As proteínas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 do CYP450 humano são as isoformas principais, as quais desempenham um papel importante no metabolismo oxidativo de 90% dos princípios ativos de medicamentos atualmente em uso clínico. Dentre essas isoformas, o CYP3A4 está envolvida no metabolismo de mais de 50% dos fármacos e outros xenobióticos.¹⁶

As interações do tipo erva-fármaco devem ser consideradas como fonte importante de alterações dos efeitos de medicamentos, visto que produtos vegetais são utilizados comumente como condimento na culinária ou na medicina popular. Um exemplo dessas interações é o caso

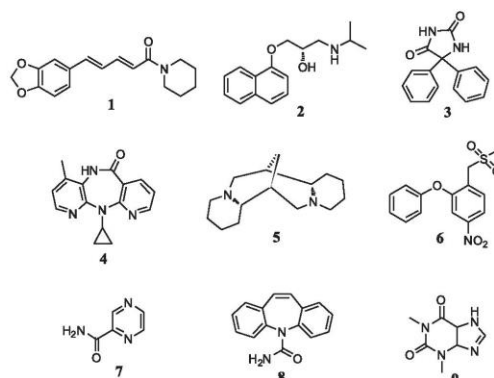


Figura 1. Moléculas estudadas neste trabalho: (1) piperina, (2) propranolol, (3) fenitoína, (4) nevirapina, (5) esparteína, (6) nimesulida, (7) pirazinamida, (8) carbamazepina e (9) teofilina

com o suco de toranja (um híbrido, resultante do cruzamento do pomelo com a laranja), que acarreta em acentuadas interações erva-fármaco principalmente devido à inibição do CYP3A4 intestinal, resultando no aumento da concentração plasmática de felodipina, nitrendipina, saquinavir, ciclosporina, terfenadina e outros compostos.^{17,18}

Mecanismos farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos têm sido considerados para explicar essas interações. As interações farmacodinâmicas são causadas ao nível da interação molécula-alvo de duas ou mais substâncias com efeitos similares ou opostos. Nesse caso, há uma alteração da resposta por parte do usuário sem afetar os processos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). As interações farmacocinéticas ocorrem quando um fármaco consegue alterar a velocidade ou extensão de processos de ADME de outro fármaco. No que concerne às alterações farmacocinéticas relacionadas ao metabolismo, o sistema microsomal hepático é uma via de inibição constante por xenobióticos, os quais podem alterar a biodisponibilidade dos fármacos no organismo.¹⁹

O *docking* molecular, também chamado de ancoramento molecular, é um procedimento computacional utilizado no desenvolvimento

*e-mail: mlaav@quimica.ufpb.br

de novos fármacos, o qual visa estabelecer as características de interação entre um ligante (micromolécula) e um alvo biológico (biomacromolécula).^{20,21} O processo de ancoramento envolve basicamente duas etapas: a predição de conformações e orientações de ligantes no sítio de ligação dos biorreceptores, bem como a atribuição de valores de energia de interação dos complexos, baseados no cálculo de potenciais clássicos.²² Deste modo, a técnica pode ser usada no entendimento do metabolismo de fármacos, o qual envolve interações do tipo ligante-proteína.

No melhor dos nossos conhecimentos, não existe até o momento um estudo teórico via ancoramento molecular que coadune para uma proposta mecanística sobre a interação seletiva entre piperina e outros fármacos, ao nível da CYP3A4. Assim, no presente trabalho, descrevemos um estudo de ancoramento molecular entre vários fármacos e a piperina nesta enzima, objetivando corroborar os dados experimentais amplamente descritos na literatura sobre o aumento na biodisponibilidade destes compostos (**2-9**, Figura 1) em presença da piperina (**1**).

METODOLOGIA COMPUTACIONAL

A estrutura cristalográfica do alvo enzimático citocromo P450-3A4 (CYP3A4) foi obtida da base de dados *Protein Data Bank* [PDB ID: 1TQN].²³ Esta estrutura foi utilizada previamente em um outro estudo de ancoragem, portanto, foi escolhida para a abordagem aqui apresentada.¹⁶ A enzima foi elucidada por cristalografia de raios-X, com resolução de 2,05 Å.²⁴ Um conjunto de nove moléculas (**1-9**, Figura 1) foram escolhidas para o estudo, de acordo com relatos na literatura sobre o aumento de suas biodisponibilidades quando co-administradas com a piperina. As moléculas foram: propranolol [DrugBank: DB00571], fenitofina [DrugBank: DB00252], teofilina [DrugBank: DB00277], nimesulida [DrugBank: DB04743], nevirapina [DrugBank: DB00238], esparteína [DrugBank: DB06727], pirazinamida [DrugBank: DB00339], carbamazepina [DrugBank: DB00564] e a própria piperina. Os ligantes foram desenhados e passaram por uma otimização de geometria inicial usando o software Avogadro²⁵ com método MMFF94 (gradiente de RMS 0.100). O software *AutoDock 4.0*²⁶ foi utilizado como escolha para conduzir os estudos no alvo CYP3A4. O módulo *AutoDock Tools* foi utilizado para preparar e analisar as simulações computacionais. Cargas *Gasteiger* e hidrogênios polares necessários aos cálculos de potenciais foram adicionados considerando a estrutura do alvo, sendo as moléculas de água retiradas. As cargas *Gasteiger* foram atribuídas também aos ligantes, sendo os hidrogênios não polares suprimidos. As ligações rotacionáveis de cada ligante foram definidas automaticamente e as ligações amídicas foram mantidas rígidas (devido a sua barreira conformacional relativamente alta). O *AutoDock* necessita de mapas de tridimensionais pré-calculados, dispostos em uma caixa composta por uma grade tridimensional de pontos (*grid maps*), em uma região definida na macromolécula (sítio alvo). O programa *AutoGrid 4.0* foi utilizado para gerar os mapas para os ligantes. A caixa foi posicionada na região catalítica da enzima entre o grupamento o grupo prostético heme e a serina-119 do CYP3A4.¹⁶ As dimensões da caixa no eixo X-, Y- e Z- foram, respectivamente, 58 Å 72 Å 70 Å com espaçamento de 0,375 Å. Essas definições foram feitas com base em artigo prévio usando mesma enzima.¹⁶ O algoritmo Genético Lamarckiano (GA-LS) foi escolhido para busca das melhores conformações com 100 corridas para cada ligante (algoritmo genético com busca local). Durante o processo de busca, a enzima foi mantida rígida, ao passo que os ligantes foram mantidos flexíveis. A população inicial foi definida como 150 e o processo de busca se deu através de conformações iniciais aleatórias. O valor máximo de avaliações de energia escolhido foi 25.000.000. O número máximo de gerações foi 27.000. O número de elitismo escolhido foi 1. As taxas de mutação de gene

e *crossover* foram definidas respectivamente como 0,02 e 0,80. Ao fim dos cálculos, 100 diferentes *poses* foram obtidas e agrupadas em diferentes *clusters*, definidos por proximidade energética e valores de RMS ("Root Mean Square deviation"), de acordo com o *default* do *AutoDock*.²⁶ A validação da metodologia utilizada foi feita através da técnica de reancoramento (*redocking*), utilizando outro PDB do mesmo alvo proteico contendo um ligante complexado ("nativo"): o fármaco bromocriptina [PDB ID: 3UA1].²⁷ Todos os cálculos foram efetuados em desktop Intel Xeon, 16 GB DDR3 RAM com Ubuntu linux 10.04. As análises moleculares e representações dos complexos foram obtidas com o pacote UCSF Chimera²⁸ e a representação das interações hidrofóbicas com o software Ligplot.²⁹

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos **1-9** (Figura 1) foram estudados via ancoramento molecular no sítio de ativo do CYP3A4 para comparar seus padrões de interação com este alvo, avaliando as suas energias de ligação em comparação com a piperina. A conformação farmacofórica para cada molécula (energia mais baixa) foi determinada a partir do *cluster* mais populoso. Os complexos podem ser visualizados na Figura 2, e na Figura 3 podem-se observar os diversos ligantes sobrepostos no sítio ativo. Na Tabela 1 estão listados os fármacos e tipos de interação com os resíduos envolvidos. Na coluna dos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, o padrão utilizado para representação foi: molécula (CYP3A4 ou fármaco): domínio protéico: número do resíduo: tipo de átomo que participa da ligação. As energias de ligação (afinidade) para cada ligante estão apresentadas na última coluna.

O reancoramento apresentou valor de RMS = 1,63 Å e energia de ligação = -13,69 kcal/mol, considerando a pose mais estável do *cluster* mais populoso. Esse procedimento é considerado satisfatório quando o RMS (o qual mede o desvio) entre a melhor pose e o ligante cristalográfico complexado é menor que 2,0 Å.³⁰ Deste modo, o valor apresentado nesta etapa valida as condições utilizadas para os ancoramentos investigados. A Figura 4 apresenta a pose cristalográfica original (azul) e após o reancoramento (verde) do fármaco bromocriptina no sítio e ligação.

Dentre todas as moléculas submetidas ao cálculo de ancoramento molecular comparativo, o complexo formado entre piperina e CYP3A4 foi o mais estável, com a energia de ligação de -8,60 kcal/mol. Isso indica uma seletividade enzima-piperina em relação aos fármacos avaliados, o que corrobora a hipótese de inibição competitiva. Para o cálculo desse parâmetro (energia de Gibbs de ligação, ΔG) o Autodock utiliza um campo de força específico, parametrizado para reproduzir energias de Gibbs derivadas de constantes de equilíbrio experimentais, o qual inclui parâmetros típicos de dispersão/repulsão, ligações de hidrogênios, fatores eletrostáticos, dessolvatação e entropia torsional.²⁶

Considerando aspectos moleculares intrínsecos, a estrutura da piperina pode ser dividida em três fragmentos: o anel metilenodioxifenila (MDP), a cadeia lateral conjugada, e o grupamento carbonila acoplado ao anel piperidínico, Figura 5.

Como podemos observar nos resultados, a porção da molécula correspondente ao anel metilenodioxifenila apresentou uma ligação de hidrogênio com a Serina-312, com comprimento de ligação de 1,613 Å, bem como interações de Van der Waals importantes com os resíduos dos aminoácidos LEU-482, LEU-483, GLN-484 e GLU-308. Já a cadeia lateral conjugada apresenta interações lipofílicas com os resíduos de ILE-369, ARG-212, ALA-370 e THR-309. Para o anel piperidínico foram observadas interações lipofílicas envolvendo o arcabouço pirrólico que compõe o grupo heme, bem como os resíduos SER-119 e ARG-105. Essas interações estão representadas na Figura 6.

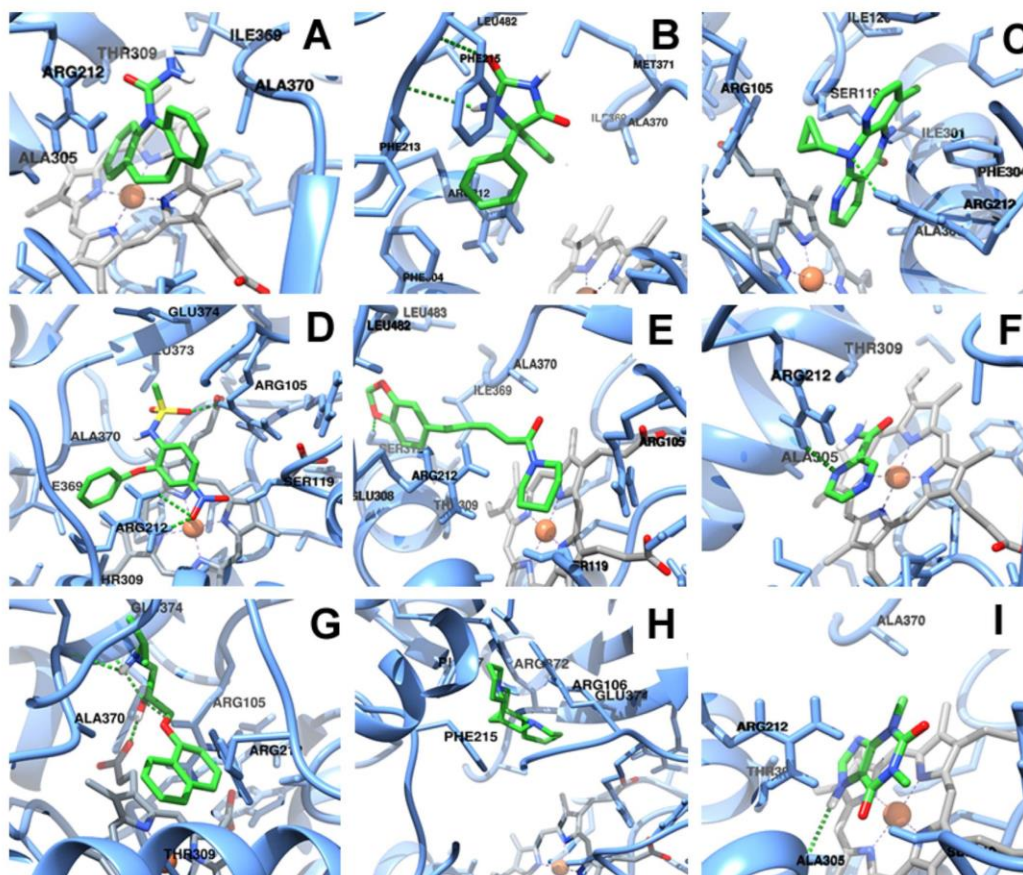


Figura 2. Ilustrações dos complexos do CYP3A4 com: (A) carbamazepina, (B) fenitoína, (C) nevirapina, (D) nimesulida, (E) piperina, (F) pirazinamida, (G) propranolol, (H) esparteína e (I) teofilina. Cadeia proteica: Bastões em azul. Ligantes: Bastões em verde com heterótomos coloridos (oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul escuro e hidrogênios em branco). Grupo heme: Bastões em cinza. Ligações de hidrogênios: Tracejados verdes

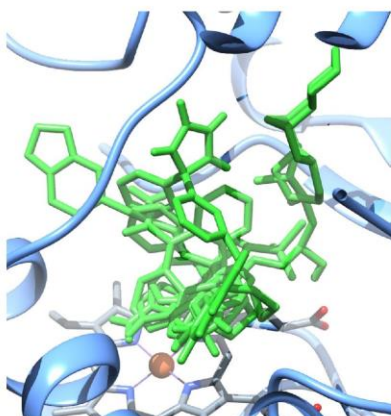


Figura 3. Sobreposição das moléculas ligantes no sítio ativo do CYP3A4

A inibição do metabolismo de fármacos pode ser um processo desejável, visto que promove aumento da biodisponibilidade de compostos suscetíveis às isoformas de CYP do sistema microsomal hepático e/ou intestino. Contudo, pode trazer severa toxicidade considerando fármacos que possuem uma pequena janela terapêutica (razão entre a dose tóxica e a dose eficaz). Em adição, efeitos colaterais de fármacos comuns podem ser aumentados, devido a uma maior quantidade de fármaco na circulação. Os resultados de ancoramento molecular apresentados neste trabalho (energia de ligação e modos de interação) estão de acordo com a capacidade da piperina inibir a CYP, isoforma 3A4,³¹ corroborando os dados da literatura sobre o aumento da biodisponibilidade de fármacos co-administrados com este produto natural.

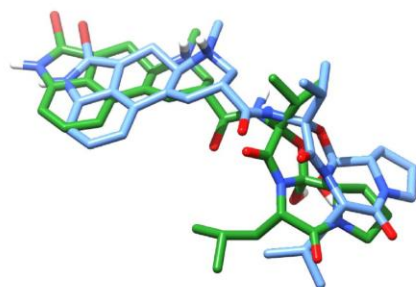
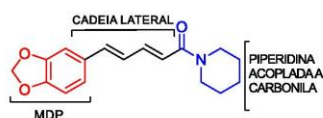
CONCLUSÃO

Os resultados teóricos de ancoramento molecular desenvolvidos neste trabalho permitiram uma melhor visão, a nível molecular, das interações entre diversos fármacos bem como da piperina na enzima CYP3A4. Foi possível observar que a piperina forma um complexo

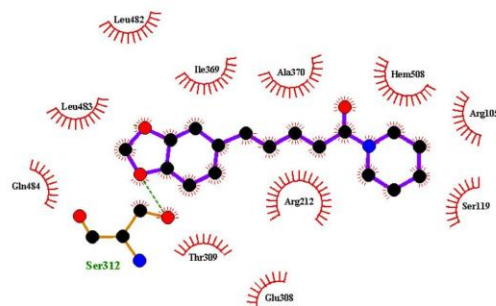
Tabela 1. Interações intermoleculares entre os compostos **1-9** e a CYP3A4

Fármacos	Doador Lig.-H	Aceptor Lig.-H	Comprim. Lig.-H	Interação vdW (escala = 1.00 Å)	Energias de ligação (Desvio padrão= 1,33)
Piperina	CYP:A:SER312:HG	FAR::O	1,613 Å	ARG105, SER119, ALA370, ILE369, ARG212, THR309, GLU308, LEU483, LEU482, GLN484, SER312, HEM508	-8,60 kcal/mol
Carbamazepina	NA	NA	NA	ALA370, ARG212, ALA305, ILE369, THR309, HEM508	-8,28 kcal/mol
Fenitoína	FAR::H CYP:A:PHE215:HN	CYP:A:PHE213:O FAR::O	1,814 Å 2,058 Å	PHE215, PHE213, ARG212, PHE304, GLY481, LEU482, MET371, ALA370, ILE369	-7,35 kcal/mol
Nevirapina	CYP:A:ARG212:HH2	FAR::N	2,148	PHE241, PHE108, ILE120, SER119, ARG105, ILE301, PHE304, ARG212, ALA305, HEM508	-7,22 kcal/mol
Nimesulida	CYP:A:ARG212:HH1 CYP:A:ARG212:HH2 CYP:A:ARG105:HE	FAR::O FAR::O FAR::O	1,691 Å 2,640 Å 1,894 Å	THR309, SER119, ILE369, ALA370, ARG105, GLU374, LEU373, ARG212, HEM508	-8,36 kcal/mol
Pirazinamida	NA	NA	NA	THR309, ALA305, ARG212, HEM508	-4,76 kcal/mol
Propranolol	FAR::H CYP:A:GLU374:HN CYP:A:ARG212:HE FAR:H	CYP:A:ARG372:O FAR::O FAR::O HEM508:O2A	1,792 Å 2,233 Å 2,088 Å 1,946 Å	THR309, ARG212, ALA370, ARG372, GLU374, ARG105, HEM508	-7,87 kcal/mol
Esparteína	NA	NA	NA	PHE215, PHE57, ARG372, GLU374, ARG106, ASP76	-6,47 kcal/mol
Teofilina	FAR::H	CYP:A:ALA305:O	2,157 Å	SER119, ALA305, THR309, ARG212, ALA370, HEM508	-5,56 kcal/mol

CYP = Enzima; FAR = Fármaco; HEM = Heme; A = Domínio proteico; O, O2A = Oxigênio – código PDB; HE, HG, HN, HH1, HH2 = Hidrogênio – código PDB; NA = Não aplicável.

**Figura 4.** Sobreposição entre a melhor pose (verde) e o ligante cristalográfico (azul)**Figura 5.** Representação esquemática dos fragmentos da piperina

mais estável no sítio catalítico do CYP3A4 em comparação com os fármacos estudados. Estes resultados sugerem a ocorrência de um mecanismo de interação mais seletiva na CYP3A4, explicando o aumento observado da biodisponibilidade dos fármacos **2-9** quando co-administrados com piperina. A abordagem aqui considerada encontra-se em consonância com as interações erva-fármaco descritas na literatura. Sendo a piperina uma molécula de fácil obtenção e baixo custo, pode ser vista como uma alternativa para desenvolvimento de inibidores das enzimas do citocromo, objetivando modular a biodisponibilidade de fármacos na terapêutica.

**Figura 6.** Interações lipofílicas e ligações de hidrogênio entre o complexo CYP3A4 e piperina

AGRADECIMENTOS

CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e pelas bolsas de IC e de produtividade.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira, W. S.; Franklin, T. N.; Lopes, N. D.; de Lima, M. E. F.; *Rev. Virtual Quim.* **2012**, *4*, 208.
2. Hanch, C.; Sammes P. G.; Anand, N.; *Contribution of Ayurvedic medicine to medicinal chemistry*. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry*, 1^a ed, Pergamon Press: Oxford, 1990.
3. Reddy, S. V.; Srinivas, P. V.; Praveen, B.; Kishore, K. H.; Raju, B. C.; Murthy, U. S.; Rao, J. M.; *Phytomedicine* **2004**, *11*, 697.
4. Pradeep, C. R.; Kuttan, G.; *Int. Immunopharmacol.* **2004**, *4*, 1795.

5. Ribeiro, T. S.; Lima, L. F.; Previato, L. M.; Previato, J. O.; Heise, N.; Lima, M. E. F.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2004**, *14*, 3555.
6. Ferreira, C.; Soares, D. C.; Barreto-Junior, C. B.; Lima, L. F.; Delorenzi, J. C.; Lima, M. E. F.; Atella, G. C.; Folly, E.; Carvalho, T. M. U.; Saraiva, B. E. M.; Pinto-da-Silva, L. H.; *Phytochemistry* **2011**, *72*, 2155.
7. Bano, G.; Raina, R. K.; Zutshi, U.; Bedi, K. L.; Johri, R. K.; Sharma, S. C.; *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1991**, *41*, 615.
8. Bano, G.; Amla, V.; Raina, R. K.; Zutshi, U.; Chopra, C. L.; *Planta Med.* **1987**, *53*, 569.
9. Kasibhatta, R.; Naidu, M. U. R.; *Drugs in R&D* **2007**, *8*, 383.
10. Atal, C. K.; Zutshi, U.; Rao, P. G.; *J. Ethnopharmacol.* **1981**, *4*, 229.
11. Gupta, S. K.; Bansal, P.; Bhardwaj, R. K.; Velpandian, T.; *Pharmacological Research* **2000**, *41*, 657.
12. Pattanaik, S.; Hota, D.; Prabhakar, S.; Kharbanda, P.; Pandhi, P.; *Phytotherapy Research* **2009**, *23*, 1281.
13. Singh, J.; Dubey, R. K.; Atal, C. K.; Love, J.; *J. Pharmacol Exp Ther Suppl. 1* **1986**, *236 S21*, 488.
14. Reen, R. K.; Roesch, S. F.; Kiefer, F.; Wiebel, F. J.; Singh, J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *218*, 562.
15. Atal, C. K.; Dubey, R. K.; Singh, J.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, *232*, 258.
16. Jayakanthan, M.; Chandrasekar, S.; Muthukumar, J.; Mathur, P. P.; *J. Mol. Graphics Modell.* **2010**, *28*, 455.
17. Baily, D. G.; Malcolm, J.; Arnold, O.; *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *46*, 101.
18. Kane, G. C.; Lipsky, J. J.; *Mayo Clin. Proc.* **2000**, *75*, 933.
19. Byrne, B. E.; *Endodontic Topics* **2003**, *4*, 9.
20. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 935.
21. Gohlke, H.; Klebe, G.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2644.
22. Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M.; *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2011**, *7*, 146.
23. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.; *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235.
24. Yano, J. K.; Wester, M. R.; Schoch, G. A.; Griffin, K. J.; Stout, C. D.; Johnson, E. F.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38091.
25. Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R.; *J. Cheminformatics* **2012**, *4*, 17.
26. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J.; *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785.
27. Sevrioukova, I. F.; Poulos, T. L.; *J. Biol. Chem.* **2011**, *287*, 3510.
28. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E.; *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605.
29. Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M.; *Protein Eng.* **1995**, *8*, 127.
30. Thomsen, R.; Christensen, M. H.; *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315.
31. Laurie, P.; Volak, S. G.; John, R. C.; Court, M. H.; *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1594.

Referências Bibliográficas

ARMELLIN, P.R.G. **Modelagem molecular de derivados pirimidínicos e estudos de docking nas enzimas ciclooxigenase 1 e ciclooxigenases**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos, 2010, p. 124 ,2010.

ATAL, C. K.; DUBEY, R. K.; SINGH, J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 232, n. 1, p. 258-262, 1985.

BAILEY, David G. et al. Grapefruit juice–drug interactions. **British journal of clinical pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 101-110, 1998.

BARRY, M.; FEELY, J. Enzyme induction and inhibition. **Pharmacology & therapeutics**, v. 48, n. 1, p. 71-94, 1990.

BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. McGraw Hill Brasil, 2012.

Chawla, P. C. "Resorine: a novel CSIR drug curtails TB treatment." **CSIR news** 60 (2010): 52-4.

COON, M.J.; DING, X.; PERNECKY, S.J.; VAZ, A.D.N. Cytochrome P450: Progress and predictions. **FASEB J.**, v.6, p.669-673, 1992.

DAVIS, I.W.; BAKER, D. RosettaLigand Docking with Full Ligand and Receptor Flexibility. **J MolBiol**, n. 385, p. 381-392, 2009.

DAVIS, I.W.; RAHA, K.; HEAD, M.S.; BAKER, D. Blin Docking of Pharmaceutically Relevant Compounds Using RosettaLigand. *ProteinSci* n. 18, p. 1998-2002, 2009. FERREIRA, Welisson S. et al. Piperina, seus Análogos e Derivados: Potencial como Antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 208-224, 2012.

DVORAK, Zdenek. Drug–drug interactions by azole antifungals: Beyond a dogma of CYP3A4 enzyme activity inhibition. **Toxicology letters**, v. 202, n. 2, p. 129-132, 2011.

FOYE, William O. **Foye's principles of medicinal chemistry**. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

GANI, O. A. B. S. M. Signposts of Docking and Scoring in Drug Design. **Chem. Biol. Drug Des.**, v.70, p. 360-365, 2007.

GOHLKE, Holger; KLEBE, Gerhard. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 15, p. 2644-2676, 2002.

HERNÁNDEZ-SANTOYO, Alejandra et al. Protein-protein and protein-ligand docking. **Protein engineering-technology and application**, 2013.

HU, Zeping et al. Herb-drug interactions. **Drugs**, v. 65, n. 9, p. 1239-1282, 2005.

JAYAKANTHAN, Mannu et al. Analysis of CYP3A4-HIV-1 protease drugs interactions by computational methods for Highly Active Antiretroviral Therapy in HIV/AIDS. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 28, n. 5, p. 455-463, 2010.

JUGE, N.; MITHEN, R. F.; TRAKA, M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 9, p. 1105-1127, 2007.

KANE, Garvan C.; LIPSKY, James J. Drug-grapefruit juice interactions. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2000. p. 933-942.

KÄPPELI, O. Cytochromes P-450 of yeasts. **Microbiological reviews**, v. 50, n. 3, p. 244, 1986.

KITCHEN, Douglas B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.

LI, Mian et al. Pungent ginger components modulates human cytochrome P450 enzymes in vitro. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 9, p. 1237-1242, 2013.

LIU, Hongtao et al. Structure-activity relationships of diamine inhibitors of cytochrome P450 (CYP) 3A as novel pharmacoenhancers, part I: Core region. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 3, p. 989-994, 2014.

MENG, Xuan-Yu et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146, 2011.

MORRIS, G. M. et al. User Guide AutoDock version 4.2. Automated Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors. 2010.

RAJNARAYANA, K.; VENKATESHAM, A.; KRISHNA, Devarakonda R. Bioavailability of diclofenac sodium after pretreatment with diosmin in healthy volunteers. **Drug metabolism and drug interactions**, v. 22, n. 2-3, p. 165-174, 2007.

RANDHAWA, Gurpreet Kaur; JAGDEV SINGH KULLAR, Rajkumar. Bioenhancers from mother nature and their applicability in modern medicine. **International Journal of Applied and basic medical research**, v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

SAKAKI, Toshiyuki; INOUE, Kuniyo. Practical application of mammalian cytochrome P450. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 583-590, 2000.

SHUGARTS, Sarah; BENET, Leslie Z. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 9, p. 2039-2054, 2009.

TAXAK, N.; BHARATHAM, P.V. Drug Metabolism A Fascinating Link Between Chemistry and Biology. **Ressonance**, v. 24, n. 3, p. 259-282, 2014.

TERAMOTO, R.; FURUKUNISHI, H. Supervised Consensus Scoring for Docking and Virtual Screening. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 47, p. 526-534, 2007.

VILLA-CRUZ, V. et al. Effect of broccoli (Brassica oleracea) and its phytochemical sulforaphane in balanced diets on the detoxification enzymes levels of tilapia (Oreochromis niloticus) exposed to a carcinogenic and mutagenic pollutant. **Chemosphere**, v. 74, n. 9, p. 1145-1151, 2009.

WANG, Hong-Jaan et al. Dietary Flavonoids Modulate CYP2C to Improve Drug Oral Bioavailability and Their Qualitative/Quantitative Structure–Activity Relationship. **The AAPS journal**, v. 16, n. 2, p. 258-268, 2014.

XU, Lianhong et al. Structure–activity relationships of diamine inhibitors of cytochrome P450 (CYP) 3A as novel pharmacoenhancers. Part II: P2/P3 region and discovery of cobicistat (GS-9350). **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 3, p. 995-999, 2014.

YURIEVA, E.; AGOSTINO, M.; RAMSLAND, P.A. Challenges and Advances in Computational Docking: 2009 in Review. **J MolRecognit**, n. 24, p. 149-164, 2001